

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-167624

⑤Int.Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ④公開 昭和61年(1986)7月29日
 A 61 K 37/02 ABN 7138-4C
 // C 07 K 7/08 6464-4H
 7/10 6464-4H
 7/64 6464-4H 審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑤4発明の名称 心臓肥大抑制剤

⑤1特 願 昭61-10308

⑤2出 願 昭61(1986)1月22日

優先権主張 ⑤31985年1月22日⑤3米国(US)⑤3693066

⑤7発 明 者 エドワード エッチ. アメリカ合衆国. 19446 ペンシルヴァニア. ランスデー
ブレイン ル. アリソン コート 104⑤1出 願 人 メルク エンド カム アメリカ合衆国. ニュージャーシー. ローウェイ. イース
パニー インコーポレ ト リンカーン アヴェニュー 126
ーテッド

⑤4代 理 人 弁理士 岡部 正夫 外3名

明 細 書

1. 発明の名称 心臓肥大抑制剤

2. 特許請求の範囲

(1) 心臓肥大抑制活性を有するペプチドの、心臓
肥大を阻止するために有効な量を投与することか
ら成る哺乳類の心臓肥大治療法。

(2) アミノ酸配列 A - Cys - Phe - Gly - Gly
- Arg - X - Asp - Arg - Ile - Gly - Ala -
Glu - Ser - Gly - Leu - Gly - Cys - Asn -
Ser - B [式中、Xは Ileまたは Metであり、A
は

Ser-,

Ser-Ser-,

Arg-Ser-Ser-,

Arg-Arg-Ser-Ser-,

Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-,

Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-,

Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-,

Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-,

Gly-Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-,
Ala-Gly-Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-,
Leu-Ala-Gly-Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-
であり、Bは

-Phe,

-Phe-Arg,

-Phe-Arg-Tyr,

-Phe-Arg-Tyr-Arg,

-Phe-Arg-Tyr-Arg-Arg

であり、C末端基はカルボキシル基またはそのア
ミドであり、Tyr 残基はヨード化またはヨード化
していなくともよい]を有する直線状または環状
ペプチドの、心臓肥大を阻止するために有効な量
を投与することから成る特許請求の範囲第(1)項記
載の方法。

(3) 有効量が約10から約2000ピコモル/kg
/分である特許請求の範囲第(1)項記載の方法。

(4) ペプチドを注入法により所定の量を投与する
ことから成る特許請求の範囲第(1)項記載の方法。

(5) ペプチドを生理学的に許容される担体と共に

投与することから成る特許請求の範囲第(1)項記載の方法。

(6) 担体が、生理食塩水またはリン酸緩衝溶液である特許請求の範囲第(5)項記載の方法。

(7) ペプチドが直線状である特許請求の範囲第(1)項記載の方法。

(8) ペプチドが環状である特許請求の範囲第(1)項記載の方法。

(9) ペプチドがジスルフィド結合により環化させることから成る特許請求の範囲第(8)項記載の方法。

適した材料を生じさせる性質に加え、この心房抽出物が強力な平滑筋弛緩作用を有することも発見された(キューリー (Currie) 等、サイエンス (Science)、第221巻、71頁、1983年)。該作用は細胞外液の容量を調節する役割と同様に血圧の調節に関し直接的かつ強力な役割を担っていることを意味している。

この発見が体液容量及び血圧の制御、充血性心疾患及び高血圧の治療における該天然物質の明確な治療の可能性をただちに認識させる重要性を有していたため、多くの研究室で心房抽出物からの活性物質(群)の単離同定並びに性質を明らかにし化学的に確立することを始めた。心房からの活性物質(群)は、心房性ナトリウム排泄因子またはANFと呼ばれたが、またカルジオナトリン(cardionatrin)(デボルド (de Bold) 等、ライフサイ、第33巻、297-302頁、1983年)、アトリオペプチン(atriopeptin)(キューリー (Currie) 等、サイエンス第111巻、67頁、1984年)、アウリクリン(auriculin)

3. 発明の詳細な説明

永年にわたって哺乳類の心房は細胞外液の容量変化を検知するために重要なセンサーとして作動していると主張されてきた(ガウアー (Gauer) 等、フィジオル・レビュー(Physiol. Rev.) 第43巻、423頁、1963年)。心房における該受容器としての役割は、体液の浸透圧濃度を制御するために重要な視床下部ホルモンであるバソプレッシンの場合に知られていた。

尿中のナトリウム排泄を増大させ、細胞外液容量の制御にも関与している物質の存在が考えられ、最近証明された。デボルド (de Bold) 等、ライフサイ(Life Sci)、第28巻、89頁、1981年はラットの部分的に精製した心房抽出物を他の麻酔ラットに注射し、尿量及び尿中のナトリウム排泄が非常に増加することを観察した。この比較的粗精製抽出物は内生ナトリウム排泄性物質の特有の性質を有していた。

強力な利尿及びナトリウム排泄効果、特に体液の容量制御における主効果を発揮するために特に

(アトラス (Atlas) 等、ネイチャー (Nature)、第309巻、717-719頁、1984年) とも呼ばれた。心房性ナトリウム排泄因子是一群のペプチドであり、共通アミノ酸配列を有するが、アミノ末端またはカルボキシル末端の1-8アミノ酸の有無により長さが異なることが示された。

本発明の目的は心臓肥大抑制剤を与えることである。また心臓肥大抑制活性を有するANFペプチドを与えることも本発明の目的である。さらにANFの生物学的に活性のあるペプチド断片を含み哺乳類に対し生理学的に投与することが適した組成物を与えることも目的である。本発明のこれらの目的及び他の目的は以下の記載から明らかになるであろう。

ANF、そのペプチドサブユニット、及びANF様活性を有する化合物が哺乳類における心臓肥大を減少させ及びなくすことが発見された。

本発明のANFペプチドはそれらの構成アミノ酸から蛋白質合成の標準的な方法、例えば、シュローダー (Schroeder) 等、ザペプチデス (The

Peptides)、第1巻、アカデミック プレス (Academic Press)、1965年; ボタンスキー (Bodanszky)等、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis) インターサイエンス パブリッシャーズ(Interscience Publishers)、1966年; マッコミー (McOmie)編、有機化学における保護基(Protective Groups in Organic Chemistry)、プレナム プレス (Plenum Press)、1973年により製造することができる。これらの文献は参考文献としてここに挿入する。

本発明のペプチドはまた、組換えDNA技術、例えば、適当なDNA配列を単離または製造し、この配列をベクターに組み込みさらにこのベクターを適当な宿主に導入し、これから目的のペプチドを発現させる、ことにより製造することができる。組換えDNA技術の使用は多くの出版物に記載されている; 例えば、マニアティス (Maniatis) 等、モレキュラー クローニング (Molecular Cloning)、ア ラボラトリー マニュアル (A Laboratory Manual)、コールド スプリング

ハーバー (Cold Spring Harbor)、ニューヨーク、1982年。この文献は参考文献としてここに挿入する。

ANFペプチド発現の適当な宿主としては、E. coli 及びビー サブティリス (B. subtilis) のような原核生物やサッカロマイセス セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae) 及びチャイニーズ ハムスターの卵細胞のような真核生物が含まれる。これらの蛋白質はワクシニア、水痘-帯状疱疹、アデノ、ヘルプス シンプレックス ウイルスのような適当な発現ベクトルにより直接哺乳類で発現させることができることも理解させるものである。

本発明の範囲内にある特異的なペプチドは以下のものである: A - Cys - Phe - Gly - Gly - Arg - X - Asp - Arg - Ile - Gly - Ala - Glu - Ser - Gly - Leu - Gly - Cys - Asn - Ser - B (式中、XはIleまたはMetであり、Aは Ser-, Ser-Ser-,

Arg-Ser-Ser-, Arg-Arg-Ser-Ser-, Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-, Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-, Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-, Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-, Gly-Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-, Ala-Gly-Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-, Leu-Ala-Gly-Pro-Arg-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser- であり、Bは

-Phe,
-Phe-Arg,
-Phe-Arg-Tyr,
-Phe-Arg-Tyr-Arg,
-Phe-Arg-Tyr-Arg-Arg

であり、C末端はカルボキシル基またはそのアミドであり、Tyr残基はヨード化またはヨード化していない(ともよい)。これらのペプチドは直線状または2個のシステイン残基の共有結合、例えば、ジスルフィド結合により環化してもよい。ヨード

化した誘導体はヨード化していないペプチドをリン酸ナトリウム緩衝液を含む媒体中クロラミン (Chloramine) - T (N-クロロ-4-メチルベンゼンスルホンアミドナトリウム塩) 存在下ヨウ化ナトリウムと処理することにより製造する。ヨード化反応はチオ硫酸ナトリウムの添加により停止させ、ヨード化ペプチドは、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) カラムにより単離する。放射活性を有するヨード化ペプチドは同様に¹²⁵Iを用いて製造する。

ヨード化誘導体はそれ自体で活性であるが、非ヨード化合成ペプチドの合成における標準物質としても有用であり、一方放射活性を有するヨード化ペプチドは本発明のペプチドのインビトロ及び臨床的な代謝半減期の研究に有用である。ヨード化誘導体は実質的に非ヨード化ペプチドと同様の生物学的活性を有する。

本発明記載の心臓肥大治療法は上記の特異的ペプチドに限定されず、上記の特異的ペプチドと同様な活性を有する同族物、類似物及び合成誘導体

を含むことを意味することが理解される。

本発明のペプチド類は、哺乳類、例えば、ハムスター、マウス、ラットにおいて電解質の均衡の疾患又は／及び変化した血管系の抵抗性を約10から約2000ピコモル/kg/分、好適には約100から約1000ピコモル/kg/分で単独に、または組合わせて治療することが有用である。ペプチド類は、例えば生理食塩水またはリン酸緩衝溶液のような適当な生理学的に許容される担体を用いて、静脈注射法により投与することができる。

以下の実施例は本発明を説明するものであるが、これを制限するものではない。以下の実施例において記載した各文献の開示は参考文献としてここに挿入する。

実施例 1

ペプチド Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Ile- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser はキュリー (Currie) 等、サイエンス、1984年1月6日号、67-69頁の記載に従って製造する。

実施例 5

ペプチド Arg- Arg- Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Ile- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr はセイダー (Seidah) 等、アロク、ナトル、アカド、サイ、(Proc. Natl. Acad. Sci.) U S A、第81巻、2640-2644頁、1984年の記載に従って製造する。

実施例 6

ペプチド Ser- Leu- Arg- Arg- Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Ile- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr はフリン (Flynn) 等、バイオケム、バイオフィス、レス、コムン、第117巻、859-865頁の記載に従って製造する。

実施例 7

ペプチド Ser- Leu- Arg- Arg- Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Met- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr はカンガワ (Kangawa) 等、バ

実施例 2

ペプチド Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Ile- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser- Phe- Arg はキュリー (Currie) 等、上記文献により製造する。

実施例 3

ペプチド Arg- Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Ile- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser- Phe- Arg はアトラス (Atlas) 等、ネイチャー、第309巻、717-719頁、1984年7月21日号の記載に従って製造する。

実施例 4

ペプチド Arg- Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Ile- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr はミソノ (Misono) 等、バイオケム、バイオフィス、レス、コムン、(Biochem. Biophys. Res. Commun.)、第119巻、524-529頁、1984年3月15日号の記載により製造する。

バイオケム、バイオフィス、レス、コムン、第118巻、131-139頁、1984年1月13日号の記載に従って製造する。

実施例 8

ペプチド Gly- Pro- Arg- Ser- Leu- Arg- Arg- Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Ile- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr はセイダー (Seidah) 等、上記文献の記載に従って製造する。

実施例 9

ペプチド Ala- Gly- Pro- Arg- Ser- Leu- Arg- Arg- Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Ile- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr はセイダー (Seidah) 等、上記文献の記載に従って製造する。

実施例 10

ペプチド Leu- Ala- Gly- Pro- Arg- Ser- Leu- Arg- Arg- Ser- Ser- Cys- Phe- Gly- Gly- Arg- Ile- Asp- Arg- Ile- Gly- Ala- Gln- Ser- Gly- Leu- Gly- Cys- Asn- Ser- Phe- Arg- Tyr はセ

イダー (Seidah) 等、上記文献の記載に従って製造する。

実施例 11

以下の結果は本発明の代表的なペプチド、即ち実施例 5 のペプチドを心臓肥大の抑制のために 30 ピコモル/kg/分の投与量で 7 日間連続注入した効果を示したものである。

心臓重量 (100 g 組織に対する g H₂O)

処理

生理食塩水	0.82 + 0.03
	n = 24
実施例 5 のペプチド	0.70 + 0.03 *
	n = 23

正常時

処理

生理食塩水	0.53 + 0.03
	n = 17
実施例 5 のペプチド	0.45 + 0.02
	n = 22

前記の結果は本発明の典型的なペプチドが心臓

肥大抑制に対し有効であることを証明するものである。

* p 値が 0.05 以下で統計的に有意

出 願 人 : メルク エンド カムパニー
インコーポレーテッド

代 理 人 : 岡 部 正 夫

安 井 幸 一

井 上 義 雄

加 藤 伸 男